GTP 和 GDP 类似物对棉铃虫神经细胞高电压敏感钙通道的调节作用

李 杰[1]，佟 帆[1]，贺秉军[1]，胡兆农[2]，刘安西[1]
（1. 南开大学生命科学学院，天津 300071；2. 西北农林科技大学农药研究所，陕西杨凌 712100）

摘要：以 Ba^{2+} 为载流子，采用全细胞膜片钳法，研究了在电极液中分别加入 G 蛋白稳定激活剂 GTPγS（GTP 类似物）和抑制剂 GDPβS（GDP 类似物）对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 3 龄幼虫神经细胞高电压敏感钙通道的调节作用。Ba^{2+} 电流记录时间为 20 min。对照组和实验组的 Ba^{2+} 电流在记录的初期均出现电流的增加现象，随后电流衰减，即“rundown”。对照组峰电流在第 20 min 时降为初始值的（72.09 ± 12.80）%。电极内液中加入 2 mmol/L GTPγS 可缓解电流的衰减现象，在第 20 min 时，峰电流为初始值的（95.99 ± 7.93）%，明显大于对照组的峰电流（$P < 0.01$），而且电流-电压（I-V）关系曲线向正电压方向移动。相反，电极内液加入 2 mmol/L GDPβS 则导致峰电流衰减更加严重，第 20 min 时，峰电流仅为初始水平的（41.95 ± 9.32）%，显著小于对照组（$P < 0.01$），但未见电流-电压（I-V）关系曲线的明显漂移。结果表明，棉铃虫神经细胞钙通道活动受 G 蛋白激活剂 GTPγS 和 G 蛋白抑制剂 GDPβS 的影响，提示 G 蛋白活动水平的改变调节钙通道的电流幅值和电压依赖性。

关键词：棉铃虫；GTP 类似物；GDP 类似物；高电压敏感钙通道；膜片钳
中图分类号：Q965 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2005)01-0031-05

Modulations of the high-voltage sensitive Ca^{2+} channels by GTP and GDP analogues in the central neurons of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*)

LI Jie[1]，TONG Fan[1]，HE Bing-Jun[1]，HU Zhao-Nong[2]，LIU An-Xi[1]（1. College of Life Sciences，Nankai University，Tianjin 300071，China；2. Department of Plant Protection，Northwestern Agricultural University，Yangling，Shaanxi 712100，China）

Abstract: Using Ba^{2+} as current carrier，the effect of G proteins on the high-voltage sensitive Ca^{2+} channels in the central neurons isolated from the 3rd instar larvae of the cotton bollworm，*Helicoverpa armigera* was studied with the whole-cell patch clamp technique. The results indicated that the inclusion of guanosine 5'-O-(3-thiotriposate)（GTPγS，2 mmol/L）in the pipette solution prevented the decline in peak current，and（95.99 ± 7.93）% of the initial current was remained by the end of 20 min recording，compared with（72.09 ± 12.80）% in the control（$P < 0.01$）. Moreover，I-V relationship curve obtained from neurons treated with GTPγS shifted to the positive voltage. In contrast，guanosine 5'-O-(2-thiophosphate)（GDPβS，2 mmol/L）in the intracellular solution reduced the peak current to（41.95 ± 9.32）% of the initial value，significantly lower than that in the control（$P < 0.01$）. No obvious shift of the I-V relationship curve was caused by GDPβS. The results showed that the activities of calcium channels were influenced by GTPγS and GDPβS，which suggests that current amplitude and voltage-dependence of calcium channels in *H. armigera are* modulated by G proteins.

Key words: *Helicoverpa armigera*；GTP analogue；GDP analogue；high-voltage sensitive calcium channel；patch clamp

G 蛋白调控细胞膜上离子通道的活动，引起离子电流增加或下降、以及通道电压依赖性的改变（Brown，1993；Hille *et al*.，1995；Albert and Robillard，2002）。研究表明，G 蛋白通过直接或间接途径对高电压敏感钙通道的电活动进行调节（Beech *et al*.，1992；Hille，1994；Sun and Dale，1999）。经高电压敏感钙通道进入细胞内的钙离子是影响神经末梢递质释放量和突触传递效率的重要因素，因此，通过调节钙通道的活动，G 蛋白在神经敏感性的调节中发挥重要作用。除介导细胞表面刺激信息的电

基金项目：国家自然科学基金资助项目(30270884)
作者简介：李杰，女，1972 年 2 月生，博士研究生，主要研究方向为动物神经生理，E-mail：dehnyu@yahoo.com.cn
收稿日期 Received：2004-01-15；接受日期 Accepted：2004-04-28

信号跨膜转导外，G 蛋白还参与基因表达和细胞生长的长期调节(陈巨莲等，2001)，并可能参与对神经系统兴奋性水平的长期调节。

研究显示，拟除虫菊酯类杀虫剂通过作用于害虫神经细胞钠通道而杀灭害虫(Bloomquist，1996)，对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的研究表明，其神经细胞钠通道是光学活性拟除虫菊酯类杀虫剂的作用靶标(贺秉军等，2003)。然而，随着拟除虫菊酯类杀虫剂的广泛使用，棉铃虫的抗药性问题日益突出。神经敏感性降低是棉铃虫抗药性的主要原因(赵勇等，1996)。进一步实验表明，抗药性棉铃虫的钠通道电流下降、电流-电压关系曲线向正电位漂移(贺秉军等，2002)。分子生物学研究进一步显示，抗药性与离子通道蛋白基因的突变密切相关(Soderlund and Knipple，2003)。G 蛋白及其偶联的第二信使和磷酸化途径对离子通道的调节作用可能影响棉铃虫神经系统的敏感性，但目前未见这方面研究的报道。本研究使用 G 蛋白稳定激活剂 GTPγS(GTP 类似物)和抑制剂 GDPβS(GDP 类似物)分别持久激活和抑制 G 蛋白的活动，观察对棉铃虫神经细胞钙通道活动的影响，旨在探讨 G 蛋白活性对钙通道的调节，以期揭示神经敏感性下降的原因，为昆虫抗药性机理的研究提供新的重要信息。

1 材料与方法

1.1 神经细胞的分离

实验用棉铃虫于 1992 年采自河北棉田，在室内温度 27±1℃、相对湿度 70%～80%和光照 14 h 的条件下连续饲养。

棉铃虫 3 龄幼虫经 70%乙醇消毒后，取胸腹神经节于 4℃的昆虫生理溶液中孵育 5 min，去除神经鞘，移至 27±1℃、0.3%的胰蛋白酶液中消化 10 min，然后转移至培养基(Hayashi and Levine，1992)中，用内径递减的玻璃吸管离散细胞，并接种于 35 mm 的塑料培养皿内。分离后的神经细胞在 27±1℃下静置 2～4 h 后贴壁，用于膜片钳记录。

1.2 膜片钳记录

选择表面光洁、核清晰、直径为 19±1 μm 的神经元用于膜片钳记录。玻璃微电极采用电极拉制仪(日本 Narishige，PP-830)两步拉制而成，尖端直径为 1～2 μm，经热抛光，电阻在 2～3 MΩ 之间。待电极与细胞间形成高阻封接后，吸破电极所吸附的细胞膜部分，形成全细胞记录模式。电流记录采用 PC-IIB 型信号放大器(华中理工大学)，并经 5 kHz 滤波；刺激方波的输出和数据的采集均通过 IBBClamp 软件包。所记录电流经 P/N 漏减处理，串联电阻补偿为 80%。所有实验均在室温 20～25℃下进行。

实验数据经 *t* 检验，以平均值±标准误表示。

1.3 溶液

记录 Ba^{2+} 电流的电极内液成分为(mmol/L)：CsCl 120，$MgCl_2$ 2，Na_2-ATP 2，BAPTA 10，Hepes 10，用 1 mol/L CsOH 调至 pH 6.6；细胞外液成分为(mmol/L)：NaCl 100，CsCl 4，$BaCl_2$ 5，$MgCl_2$ 2，Hepes 10，葡萄糖 5，TEA-Cl 20，TTX 0.001，用 1 mol/L NaOH 调至 pH 6.6；GTPγS 和 GDPβS 直接溶于电极内液中。CsCl 和 Hepes 购自 Gibco 公司，CsOH、BAPTA、GTPγS 和 GDPβS 购自 Sigma 公司，其他试剂均为国产分析纯。

2 结果

2.1 正常全细胞 Ba^{2+} 电流

以 Ba^{2+} 为载流子，获得的通道电流比 Ca^{2+} 电流幅度大、失活更缓慢，而且在长时间记录下电流衰减程度小。全细胞膜片钳模式下，将钳制电压设为 −70 mV、刺激电压由 −60 mV 至 +50 mV 并以 10 mV 步幅递增，可以记录到一组在 −40 mV 左右激活、在 0 mV 左右达到峰值的高电压敏感 Ba^{2+} 电流(图 1：A)，电流-电压(I-V)关系见图 1(B)。实验中每 2 min 记录 1 次电流，初期出现电流增加现象，随后电流开始衰减，即所谓“rundown”(表 1)。至记录的第 20 min 时，峰电流为初始值的(72.09±12.80)%($n=8$)，电流-电压(I-V)关系曲线上移，如图 1(B)所示。

2.2 GTPγS 作用下的 Ba^{2+} 电流

形成全细胞膜片钳模式后，每 2 min 作一次记录。第 0 min 时的 I-V 关系曲线与对照组基本吻合(图 2：A)，表明加在电极内液中的药物在记录初期没有发挥作用，对电流幅值及电压依赖性均没有影响。与对照组相似，电流在记录初期增加，随后缓慢下降，但电流衰减明显缓解，说明药物开始透析入细胞内液发挥作用。在第 14 min 时，用药组的峰电流值已经明显大于对照组，至第 20 min 时，差异达到极显著(表 1)。电流随时间的变化率显示，用药组第 20 min 时的峰电流为初始值的(95.99±7.93)%(图 3)，电流衰减明显小于对照组($P<0.01$)。另外，在第 20 min 时，I-V 关系曲线向正电压方向移动约 10 mV(图 2：A)。

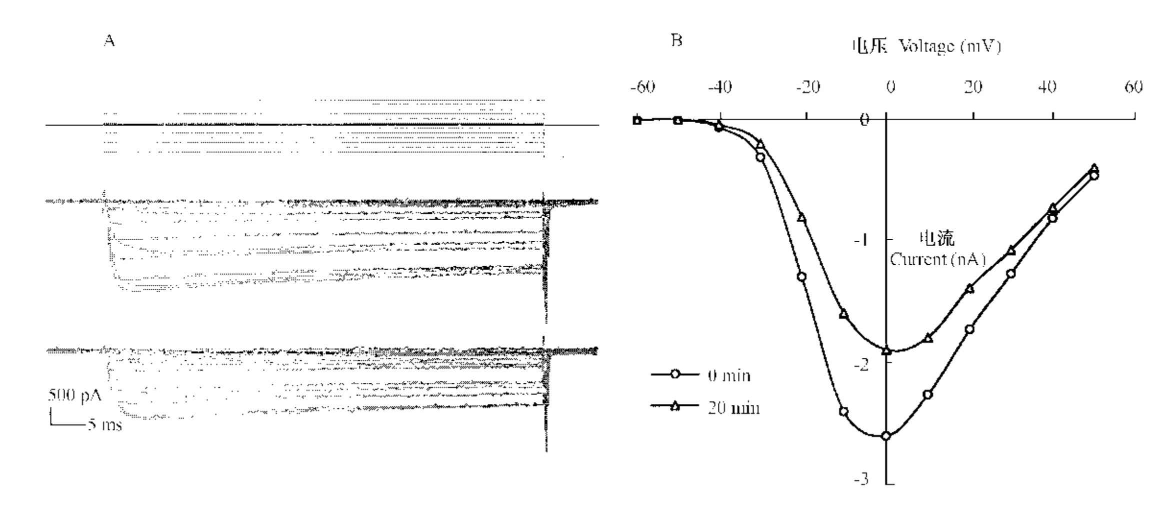


图 1　第 0 min 和第 20 min 时对照组神经细胞 Ba^{2+} 电流和钙通道电流-电压关系曲线

Fig. 1　Typical Ba^{2+} curves and the I-V relationship of Ba^{2+} current *vs* test voltage in the control

A. 刺激脉冲与同一细胞上第 0 min 和第 20 min 时的 Ba^{2+} 电流 The upper lines show stimulating voltages from −60 mV to +50 mV for 60 ms, with holding potential of −70 mV; the middle and lower lines show Ba^{2+} currents recorded in one neuron at 0 min and 20 min, respectively; B. 第 0 min 和第 20 min 时钙通道电流-电压关系曲线 I-V relationship curves of current value *vs* test potential at 0 min and 20 min, respectively（$n=8$）.

表 1　对照组和加 GTPγS 组在不同时间内的峰电流统计和 *t*-检验

Table 1　The statistical analysis and *t*-test of peak currents recorded every two minutes in the control（$n=8$）and GTPγS-treated（$n=9$）neurons during the period of recording

处理 Treatment	时间 Time（min） 0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
对照 CK（nA）	2.732 ± 0.323	3.144 ± 0.236	3.139 ± 0.249	2.977 ± 0.232	2.839 ± 0.243	2.709 ± 0.238	2.582 ± 0.236	2.429 ± 0.226	2.264 ± 0.215	2.110 ± 0.367	1.961 ± 0.365
GTPγS（nA）	2.658 ± 0.204	3.214 ± 0.284	3.239 ± 0.348	3.209 ± 0.349	3.134 ± 0.361	3.051 ± 0.344	2.953 ± 0.341	2.868 ± 0.355	2.797 ± 0.345	2.702 ± 0.335	2.609 ± 0.305
P（*t*-test）	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.01

数据为平均值 ± 标准误 Data are mean ± *SE*; $P<0.05$：差异显著 Significant different; $P<0.01$：差异极显著 Extremely significant different; 下同 The same below.

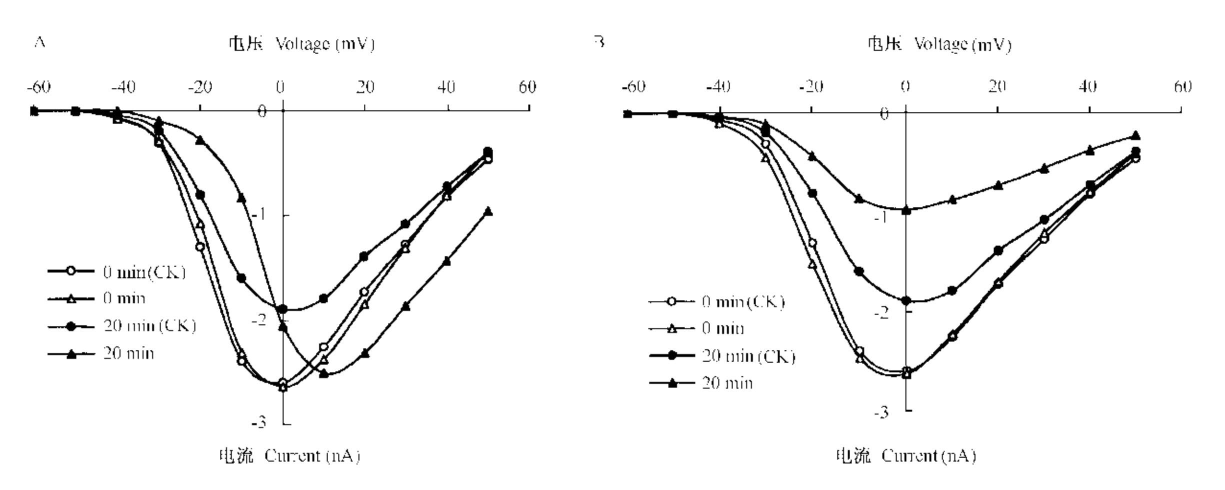


图 2　GTPγS 和 GDPβS 作用下的钙通道电流-电压关系曲线

Fig. 2　The I-V relationship of Ba^{2+} current *vs* voltage in GTPγS-treated and GDPβS -treated neurons

A：GTPγS 对 Ba^{2+} 电流的加强作用 The enhancing effect of GTPγS on the Ba^{2+} current;

B：GDPβS 对 Ba^{2+} 电流的抑制作用 The inhibitory effect of GDPβS on the Ba^{2+} current.

2.3 GDPβS作用下的 Ba^{2+} 电流

每2 min记录一次电流。第0 min时的I-V关系曲线与对照组基本吻合(图2:B),说明GDPβS尚未发挥作用。在记录初期电流增加,随后下降,不同于对照组的是,电流衰减加剧,在第12 min时,峰电流值已经明显小于对照组,至第16 min时,差异达到极显著(表2),表明药物发挥了作用。电流变化百分比显示,第20 min时的峰电流为初始值的(41.95±9.32)%(图3),与对照组相比,电流下降明显($P<0.01$)。在记录时间内,GDPβS组I-V关系曲线上移,显示电流受到抑制,但未见电压依赖性的明显改变(图2:B)。

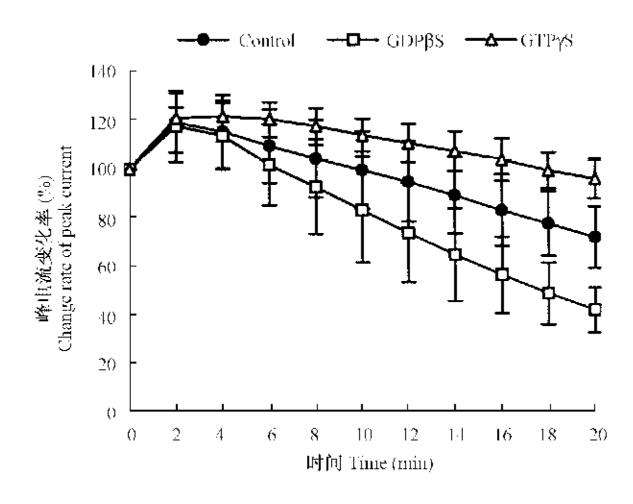


图3 对照组、加GTPγS组和加GDPβS组峰电流在不同时间的变化率

Fig. 3 The change rate of peak current amplitude *vs* recording time in the control, GTPγS-treated and GDPβS-treated neurons at different time

表2 对照组和加GDPβS组在不同时间内的峰电流统计和 *t*-检验

Table 2 The statistical analysis and *t*-test of peak currents recorded every two minutes in the control ($n=8$) and GDPβS-treated ($n=11$) neurons during the period of recording

	时间 Time (min)										
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
对照 CK(nA)	2.732±0.323	3.144±0.236	3.139±0.249	2.977±0.232	2.839±0.243	2.709±0.238	2.582±0.236	2.429±0.226	2.264±0.215	2.110±0.367	1.961±0.365
GDPβS(nA)	2.623±0.296	3.108±0.349	2.997±0.319	2.689±0.303	2.453±0.351	2.205±0.364	1.957±0.345	1.712±0.301	1.492±0.255	1.285±0.203	1.123±0.334
P(*t*-test)	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01

3 讨论

3.1 对钙通道电流幅值的影响

GTPγS是GTP的缓慢水解类似物,能够从G蛋白α亚基的鸟苷酸结合位点上置换GDP,而不能被GTP酶水解,是G蛋白持久激活剂;相反,GDPβS则是GDP的缓慢水解类似物,能够与G蛋白α亚基的鸟苷酸结合位点紧密结合,可以持久抑制G蛋白的水解。GTPγS在一定程度上缓解 Ba^{2+} 电流的衰减现象,以及GDPβS使 Ba^{2+} 电流进一步降低,均提示G蛋白基础活性的改变能够影响钙通道电流。Beech等(1992)以大鼠交感神经元为材料研究证明,G蛋白可以通过直接途径也可以通过间接途径抑制钙通道电流。Diverse-Pierluissi等(1995)以鸡感觉神经元为材料的研究认为,G蛋白可以通过水解α亚基和βγ二聚体直接抑制N-型钙电流。Ewald等(1988)发现,G蛋白通过α亚基直接作用于钙通道。Herlitze等(1996)的研究则发现G蛋白抑制大鼠交感神经元钙电流的活性单位是βγ二聚体。目前,对通道蛋白进行点突变的研究则支持βγ二聚体直接作用于通道的观点(De Waard *et al.*, 1997)。此外,相当多的研究表明,G蛋白偶联的磷酸化途径能够间接调节钙通道电流(Artalejo *et al.*, 1992)。在本研究中,GTPγS和GDPβS不仅影响G蛋白水解的水平,也可以通过G蛋白活动的改变而影响其偶联的磷酸化途径,因此,本研究提示G蛋白能够通过水解后的亚基或是与其偶联的磷酸化途径调节钙通道电流。此前用百日咳毒素预孵神经细胞改变钙通道电流和cGMP引起钙通道电流下降的结果都提示钙通道的活动受G蛋白或其偶联第二信使-磷酸化途径的调节(李杰等,2004a,2004b)。然而,目前的结果尚不能确定G蛋白是通过直接途径还是间接途径发挥作用的。此外,GTPγS和GDPβS不能特异性标记G蛋白的种类。但本研究明确提示,G蛋白基础活性的改变参与对棉铃虫钙通道电流的调节。

3.2 对钙通道电压依赖性的影响

此外，GTPγS 引起电流-电压关系曲线向正电位方向漂移，提示通道电压依赖性受 G 蛋白活动的调节。Beech 等（1992）证明，G 蛋白的直接作用引起钙通道电压依赖性向正方向移动；Ma 等（1994）发现 G 蛋白基础活性改变能够引起钠通道激活和失活电压的移动。棉铃虫神经细胞与百日咳毒素预孵实验显示，解除抑制性 G 蛋白对腺苷酸环化酶系统的抑制作用能够促使电流-电压关系曲线向负电位偏移（李杰等，2004a），提示磷酸化作用可能使电压敏感性向负向移动。在本研究中，GTPγS 引起的电压依赖性向正向偏移则可能是 G 蛋白 βγ 二聚体直接作用于通道的结果；而 GDPβS 作用下未见电流-电压关系曲线的明显偏移，可能与 G 蛋白水解受抑制有关。总之，结果表明 G 蛋白基础活动的改变能够影响钙通道的电压敏感性，而电压敏感性与细胞的兴奋性密切相关。

参 考 文 献（References）

Albert PR, Robillard L, 2002. G protein specificity: Traffic direction required. *Cellular Signalling*, 14: 407 – 418.

Artalejo CR, Rossie S, Perlman RL, Fox AP, 1992. Voltage-dependent phosphorylation may recruit Ca^{2+} current facilitation in chromaffin cells. *Nature*, 358: 63 – 66.

Beech DJ, Bernheim L, Hille B, 1992. Pertussis toxin and voltage dependence distinguish multiple pathways modulating calcium channels of rat sympathetic neurons. *Neuron*, 8: 97 – 106.

Bloomquist JR, 1996. Ion channels as targets for insecticides. *Annu. Rev. Entomol.*, 41: 163 – 190.

Brown AM, 1993. Membrane-delimited cell signaling complexes: direct ion channel regulation by G proteins. *J. Membrane Biol.*, 131: 93 – 104.

Chen JL, Weng GZ, Ni HX, 2001. The advancement of G protein and coupled signal transduction pathways. *Chinese J. Biotech.*, 17(2): 113 – 117.[陈巨莲，Ge-zhi Weng，倪汉祥，2001. G 蛋白及其偶联信号传导途径的研究进展. 生物工程学报，17(2): 113 – 117]

De Waard M, Liu H, Walker D, Scott VES, Gurnett CA, Campbell KP, 1997. Direct binding of G-protein βγ complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature*, 385: 446 – 450.

Diverse-Pierluisssi M, Goldsmith PK, Dunlap K, 1995. Transmitter-mediated inhibition of N-type calcium channels in sensory neurons involves multiple GTP-binding proteins and subunits. *Neuron*, 14: 191 – 200.

Ewald DA, Sternweis PC, Miller RJ, 1988. Guanine nucleotide-binding protein, Go-induced coupling of neuropeptide Y receptors to Ca^{2+} channels in sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 3 633 – 3 637.

Hayashi JH, Levine RB, 1992. Calcium and potassium currents in leg motoneurons during postembryonic development in the hawkmoth *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.*, 171: 15 – 42.

He BJ, Liu AX, Chen JT, Sun JS, Rui CH, 2002. Effects of cyhalothrin on the sodium and calcium channels in central neurons of *Helicoverpa armigera*. *Acta Biophysica Sinica*, 18(2): 201 – 205.［贺秉军，刘安西，陈家童，孙金生，芮昌辉，2002. 三氟氯氰菊酯对棉铃虫神经细胞钠及钙通道作用机理研究. 生物物理学报，18(2): 201 – 205］

He BJ, Liu DB, Chen Q, Liu AX, Wang QM, Huang RQ, Rui CH, 2003. Effect of optically-active pyrethroid on sodium channels in the central neurons of *Helicoverpa armigera*. *Acta Entomol. Sinica*, 46(2): 156 – 160.［贺秉军，刘东波，陈强，刘安西，汪清民，黄润秋，芮昌辉，2003.光学活性拟除虫菊酯对棉铃虫神经细胞钠通道电流的影响. 昆虫学报，46(2): 156 – 160］

Herlitze S, Garcia DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T, Catterall WA, 1996. Modulation of Ca^{2+} channels by G-protein βγ subunits. *Nature*, 380: 258 – 262.

Hille B, 1994. Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends in Neurosci*, 17: 531 – 536.

Hille B, Beech DJ, Bernheim L, Mathie A, Shapiro MS, Wollmuth LP, 1995. Multiple G-protein-coupled pathways inhibit N-type Ca^{2+} channels of neurons. *Life Sci.*, 56: 989 – 992.

Li J, He BJ, Liu AX, 2004a. Modulation of the voltage-gated sodium and calcium channels by pertussis toxin sensitive Gi protein in neurons isolated from cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Acta Biophysica Sinica*, 20(1): 26 – 30.［李杰，贺秉军，刘安西，2004a. 百日咳毒素对棉铃虫神经细胞电压门控钠、钙通道的调节作用. 生物物理学报，20(1): 26 – 30］

Li J, Du YZ, Tong F, He BJ, Liu AX, 2004b. Modulations by cAMP and cGMP of the high-voltage activated Ca^{2+} channels in the central neurons isolated from cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Acta Entomol. Sin.*, 47(4): 429 – 433.［李杰，杜育哲，佟帆，贺秉军，刘安西，2004b. cAMP 和 cGMP 对棉铃虫神经细胞高电压激活钙通道的调节作用. 昆虫学报，47(4): 429 – 433］

Ma JY, Li M, Catterall WA, Scheuer T, 1994. Modulation of brain Na^{+} channels by a G-protein-coupled pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 12 351 – 12 355.

Soderlund DM, Knipple DC, 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 563 – 577.

Sun QQ, Dale N, 1999. G-proteins are involved in 5-HT receptor-mediated modulation of N- and P/Q- but not T-type Ca^{2+} channels. *J. Neurosci.*, 19: 890 – 899.

Zhao Y, Liu AX, Ru LJ, Fan XL, Wei C, 1996. Decrease in neural sensitiveness underlines the mechanism of pyrethroid-resistance in *Helicoverpa armigera*. *Acta Entomologica Sinica*, 39(4): 347 – 352.［赵勇，刘安西，茹李军，范贤林，魏岑，1996. 神经敏感性的降低是棉铃虫对拟除虫菊酯抗药性的重要机制. 昆虫学报，39(4): 347 – 352］

（责任编辑：黄玲巧）